Həyat elmləri və biotibb jurnalı, cild 74, №2, səh. 69-77 (2019)

AmpliSeq texnologiyası əsasında buğda bitkisi üçün genotipləşdirmə panelinin yaradılması

M.Ə. Abbasov

AMEA Genetik Ehtiyatlar İnstitutu, Azadlıq prospekti, 155, Bakı AZ 1106, Azərbaycan;
E-mail: mehraj_genetic@yahoo.com
Çapa qəbul edilmişdir: 18.10.2019

PZR-GBS və ya amplikonların sekvenslənməsi selektiv praymerlərin istifadəsi ilə genom mürəkkəbliyinin azaldılmasının alternativ üsulu olub bitki seleksiyası və genom tədqiqatları üçün əvəzolunmaz vasitədir. Tədqiqat işində ilk dəfə olaraq buğda genomunu (A, B və D) əhatə edən 830 praymerdən ibarət PZR-genotipləşdirmə paneli yaradılmışdır. Filtirləmə nəticəsində yeni yaradılmış panel 401 yüksək keyfiyyətli markerdən təşkil olunmuşdur. Üç buğda genomu arasında B genomu ən yüksək (151 tək nukleotid polimorfizmi (TNP)), D genomu isə (88 TNP) ən aşağı marker sıxlığına malik olmuşdur. 21 xromosom arasında 1B və 3B xromosomları ən çox, 3D və 4D xromosomları isə ən az TNP ilə səciyyələnmişlər. Tranzisiya (Ts) tipli TNP-lərin rastgəlmə tezliyi (84%), transversiya (Tv) tipli TNP markerlərdən (16%) kifayət qədər yüksək olub, Ts/Tv nisbəti 5,3 vahid təşkil etmişdir. Yeni yaradılmış panel yumşaq buğda (*T. aestivum* L.) kolleksiyasında yoxlanılmış, 69 yumşaq buğda nümunəsi üçün genetik müxtəliflik əmsalı və polimorfizm informasiya tutumu, müvafiq olaraq 0,252 və 0,205 vahid təşkil etmişdir. Ən yüksək polimorfizm var. *ferrugineum* və var. *milturum*, ən az müxtəliflik isə var. *hostianum* növmüxtəlifliyi üçün qeydə alınmışdır. PCoA analizi ilk üç koordinant variasiyanın 22,5%-ni izah etmişdir. Genotipləşdirmə panelinə daxil edilmiş TNP markerlər unikal profilə malik genotipləri aşkar etməyə və bütöv kolleksiyada genetik müxtəlifliyi qiymətləndirməyə imkan vermişdir.

Açar sözlər: *Yumşaq buğda genomu, PZR-genotipləşdirmə, amplikon sekvensi, multipleksləmə, TNP, tranzisiya, transversiya*

GİRİŞ

Buğda (*T. aestivum* L.) hazırda dünya üzrə ən çox becərilən və istehlak olunan biki olub 220 milyon hektardan çox sahədə becərilməklə əhalini gündəlik 15% kalori ilə təmin edir (Balfourier et al., 2019). Durmadan artan dünya əhalisinin çörəyə olan tələbatının ödənilməsi üçün buğda istehsalının da müntəzəm şəkildə artırılması tələb olunur (Ray et al., 2013). Əkinə yararlı torpaqların az olduğu müasir dövrdə buğda bitkisinin məhsuldarlığının artırılması yalnız "ikinci yaşıl inqilab" – mövcud təbii resursların və genetik müxtəlifliyin aşkarlanması və daha düzgün istifadəsi hesabına əldə oluna bilər (Lynch, 2007). Buğda bitkisinin böyük ölçülü (17Gb), kompleks genomu yüksək sıxlıqlı TNP (tək nukleotid polimorfizmi) xəritələşdirmə işlərini çətinləşdirsə də buğdaların dünya əhalisinin qida rasionunda önəmli paya sahib olması onlar üzərində mütəmadi olaraq, genetik tədqiqatların və seleksiya işlərinin aparılmasını zəruri edir. Yeni Nəsil Sekvens (YNS) texnologiyalarının kəşfi və sürətli inkişafı, müxtəlif YNS genotipləşdirmə üsullarının (GBS, RAD-seq, DArT-seq) tətbiqi heksaploid buğda genomunun (AABBDD) oxunmasına və minlərlə TNP markerlərin aşkarlanmasına imkan vermişdir (Appels et al., 2018).

YNS genotipləşdirmə yeni tək nukleotid polimorfizmlərinin aşkar edilməsi, genetik variasiyanın qiymətləndirilməsi, genetik və assosiativ xəritələrin qurulması kimi məqsədlər üçün həyata keçirilən genetik skrininq üsulu olub, aşağı variasiyaya və buğda kimi mürəkkəb genoma malik populyasiyaların tədqiqi üçün ucuz və sürətli üsul kimi qiymətləndirilir. Multipleks PZR və barkodlaşmanın kəşfi fonunda YNS texnologiyalar arasında eyni anda yüzlərlə genotip üzərində yüzlərlə TNP markeri əldə etməyə imkan verən amplikon sekvens üsulu daha etibarlı və effektiv hesab edi-

lir. Amplikon sekvensləmə və ya PZR-GBS selektiv praymerlərin istifadəsi ilə genom mürəkkəbliyinin azaldılmasının alternativ üsulu olub bitki seleksiyası və genom tədqiqatları üçün əvəzolunmaz vasitədir. Amplikon sekvens üsulu PZR məhsulların (amplikonların) sekvensi yolu ilə genomun spesifik hissələrindəki genetik variasiyaları tədqiq etməyə imkan verir (Ogiso-Tanaka et al., 2019). Üsul lazım olan genom hissələrinin hədəflənməsi və əhatə olunması üçün dizayn olunmuş oliqonukleotid probların istifadəsi ilə PZR-ın aparılması və daha sonra YNS metodları ilə sekvensinə əsaslanır. Amplikon sekvensi nadir somatik mutasiyaların təyini üçün olduqca səmərəli olub, üsulun ən mühüm üstünlüyü multipleksləmə vasitəsilə yüzlərlə genin bir dövrədə sekvens edilməsidir. Sekvens kitabxanaları cəmi 5-8 saata hazırlana və 17-32 saata sekvens oluna bilər.

AmpliSeq texnologiyası insan genetik xəstəliklərinin tədqiqi ilə yanaşı, arpa (Tanaka et al., 2019), qarğıdalı (Jamann et al., 2017), düyü (Gao et al., 2018) və soya (Ogiso-Tanaka et al., 2019) kimi bir sıra bitkilərdə də uğurla tətbiq olunmuşdur. Buğda bitkisində amplikon sekvensi panelinin yaradılması böyük həcmli genomun tam resekvenslənməsini həyata keçirmədən hədəflənmiş məhdud regiondan yeni, təsərrüfat əhəmiyyətli TNP-ləri aşkar etməyə, bu yolla zamana və maliyyə xərclərinə qənaət etməyə imkan verər.

Tədqiqat işində əsas məqsəd dünyada ilk dəfə olaraq buğda bitkisində genetik variantların daha effektli təyini üçün PZR-genotipləşdirmə panelinin yaradılmasıdır.

MATERİAL VƏ METODLAR

Tədqiqat işində Milli Genbankdan əldə olunmuş yumşaq buğdanın (*Triticum aestivum* L.) müxtəlif növmüxtəlifliklərinə aid 69 nümunəsindən istifadə edilmişdir (Cədvəl 1).

Buğda bitkisinin amplikon sekvenslənməsi Schnable laboratoriyasının 2015-ci ildə təqdim etdiyi protokol əsasında yerinə yetirilmişdir (Schnable, 2015). Tədqiqatda ilk dəfə olaraq buğda genomu (A, B və D) üzrə 830 praymer dizayn edilmişdir (Sigma arrive @ 100 µM). Praymerlər 100 µM qatılığa qədər durulaşdırıldıqdan sonra hər qrupda orta hesabla 30 TNP (30 praymer) olmaqla bir neçə qrupa bölünmüşdür.

Cədvəl 1. İstifadə olunmuş yumşaq buğda (*T. aestivum* L.) nümunələri

№	Növmüxtəlifliyi	№	Növmüxtəlifliyi	№	Növmüxtəlifliyi
6921	v. *graecum*	6964	v. *ferrugineum*	7027	v. *hostianum*
6923	v. *graecum*	6965	v. *ferrugineum*	7028	v. *hostianum*
6926	v. *graecum*	6966	v. *ferrugineum*	7029	v. *hostianum*
6927	v. *graecum*	6968	v. *ferrugineum*	7032	v. *meridionale*
6936	v. *milturum*	6969	v. *ferrugineum*	7033	v. *meridionale*
6937	v. *milturum*	6970	v. *ferrugineum*	7034	v. *leucospermum*
6938	v. *milturum*	6971	v. *ferrugineum*	7036	v. *velutinum*
6939	v. *milturum*	6972	v. *ferrugineum*	Qiymətli -2/17	v. *velutinum*
6941	v. *milturum*	6983	v. *lutescens*	Qrekum -75/50	v. *graecum*
6942	v. *milturum*	6985	v. *lutescens*	Arzu	-
6943	v. *milturum*	6987	v. *lutescens*	Gürgənə-1	v. *erythrospermum*
6944	v. *erythrospermum*	6989	v. *lutescens*	Qarabağ	-
6945	v. *erythrospermum*	6992	v. *lutescens*	Zərdabi	-
6946	v. *erythrospermum*	7008	v. *albidum*	Mirbəşir -128	v. *erythrospermum*
6847	v. *erythrospermum*	7010	v. *albidum*	Günəşli	v. *erythrospermum*
6948	v. *erythrospermum*	7011	v. *albidum*	Əzəmətli -95	v. *graecum*
6949	v. *erythrospermum*	7012	v. *albidum*	Ruzi- 84	v. *graecum*
6950	v. *erythrospermum*	7014	v. *albidum*	Qobustan	v. *graecum*
6959	v. *alborubrum*	7016	-	Azəri	v. *lutescens*
6960	v. *alborubrum*	7017	-	Şəfəq	v. *lutescens*
6961	v. *alborubrum*	7019	v. *barbarossa*	Qırmızı gül-1	v. *erythrospermum*
6962	v. *alborubrum*	7020	v. *barbarossa*	Yeganə	v. *lutescens*
6963	v. *alborubrum*	7023	v. *barbarossa*	Şəki-1	v. *ferrugineum*

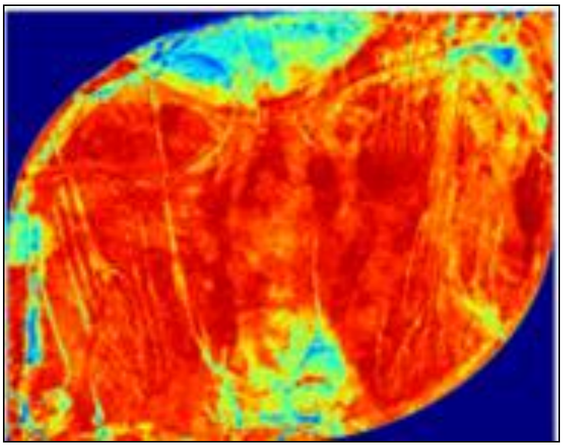
TNP spesifik PZR praymerlər üçün CS1 (5'-ACACTGACGACATGGTTCTACA-3') və CS2 (5'-TACGGTAGCAGAGACTTGGTCT-3') adaptorlarından (Fluidigm) istifadə olunmuşdur. Hər bir nümunəyə aid gDNT-si (10–50 ng/µl, 1.5 µl) 96 yuvacıqlı PZR qabının ayrı-ayrı yuvacıqlarına yerləşdirilmiş, hər bir yuvacığa 3.5 µl PZR master qarışığı (100 nM praymer qarışığı, 1X Life Technologies şirkətinin Platinum® Multiplex PCR Master Mix məhlulu) əlavə edilmişdir. PZR proqramı aşağıdakı kimi tərtib olunmuşdur: 1) 94°C – 10 dəq; 2) 10 tsikl 94°C – 20 san, 64-56 °C - 1 dəq (temperaturu hər tsikildə 0.8°C aşağı salmaqla); 3) 20 tsikl 94°C - 20 san, 57 °C - 60 san, 68 °C - 30 san; 4) 72 °C – 3 dəq; 5) 4 °C. Növbəti mərhələdə bir nümunəyə aid bütün amplikonların birləşdirilməsi həyata keçirilmişdir. Bunun üçün hər bir PZR reaksiyasından 5 µl götürülərək yeni PZR qabının yuvacıqlarına köçürülmüş, eyni gDNT-yə malik olan nümunələrin PZR reaksiyaları 1 yuvacıqda birləşdirilmişdir. Daha sonra PZR məhsullardan 2 µl götürülərək yeni PZR qabına köçürülmüş, barkodlaşma üçün hər bir yuvacığa 2 pm barkod praymerindən 1 µl əlavə edilmişdir. Ümumi həcmi 5 µl olan PZR qarışığı (1.25X Standart NEB Taq Buferi, 500 µM dNTP, 100nM Universal Əksinə Praymer, 1U/rxn NEB Taq polimeraza) hazırlanaraq yuxarıda göstərilmiş proqram üzrə amplifikasiya həyata keçirilmişdir. Kitabxana bir yerə cəmləşdirildikdən (birləşdirildikdən) sonra PZR saflaşdırma sütünlarından istifadə etməklə PZR amplikon toplusu təmizlənmiş, PZR-GBS kitabxanasının amplifikasiyası həyata keçirilmişdir. Amplifikasiya olunmuş kitabxana ~3 pg/ µl qatılığa qədər durulaşdırılmış, PGM OneTouch sistemində (Life Technologies) Ion PGM HI-Q View Template Kit vasitəsilə istehsalçıların protokoluna uyğun qaydada emulsion PZR aparılmışdır. Zənginləşdirilmiş ISP (Ion Sphere Particles) kürəcikləri Ion PGM platformasında (Life Technologies) Ion 318 çipi və sekvens kiti (Ion PGM Hi-Q Sequencing Kit; Life Technologies) vasitəsilə 200 n.c. uzunluğunda tək sonluqlu oxunma konfiqurasiyasına uyğun şəkildə sekvens olunmuşdur.

Sekvensin nəticələri və TNP çağırışı TASSEL 3.0 bioinformatik analiz proqram dəstinin bir hissəsi olan UNEAK (Universal Network Enabled Analysis Kit) GBS analitik təchizat sistemi (pipeline) vasitəsilə həyata keçirilmişdir (Bradbury et al., 2007). Aşağı keyfiyyət göstəricisinə malik oxunmalar kənarlaşdırılmış və heteroziqotluğu < 10%, minor allel tezliyi > 1% və çatışmayan (missing) markerləri < 20% olan TNP-lər sonrakı analizlər üçün istifadə olunmuşdur. Oxunmaların referens (istinad) genomuna uyğun nizamlanması BLASTn analizi ilə həyata keçirilmişdir.

AmpliSeq verilənləri əsasında Ney genetik məsafə indeksinin təyini, klaster analizi, əsas koordinant analizi (PCoA) və NJ (Neighbour-joining) dendroqramının tərtibi DARwin 6.0 (Perrier and Jacquemoud-Collet, 2006) proqram paketi ilə yerinə yetirilmişdir.

NƏTİCƏLƏR VƏ ONLARIN MÜZAKİRƏSİ

Buğda genomu üçün yaradılmış ilk PZR-genotipləşdirmə paneli bütün genomu (A, B və D) əhatə edən 830 praymerdən təşkil olunmuşdur. Sekvens üçün 11 kitabxana hazırlanmış, 11 milyon yuvacığa malik 318 çipinin doldurulma faizi 65-78%, bir dairədə oxunmaların sayı isə 3.8-4.5x10^5 arasında dəyişmişdir (Şəkil 1).



Şəkil 1. Yüklənmə faizini göstərən Ion 318_{TM} v2 çipinin psevdo-rəngli şəkli. Qırmızı rəng 100% yüklənməni, göy rəng isə o hissədəki yüklənməyən yuvacıqları göstərir. Hər bir 318 çipi 11 milyon yuvacığa malikdir.

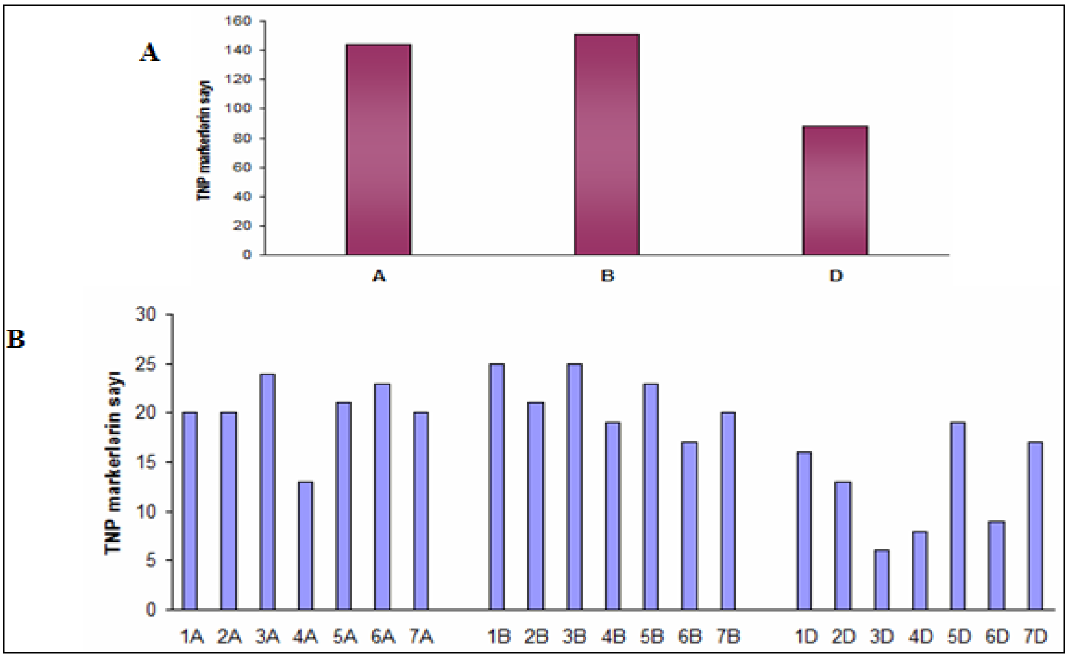
Ümumilikdə, kolleksiya üçün 830 genetik variant aşkar olunmuş, TNP markerləri arasından monomorf markerlər (praymerlər) çıxdaş edilmişdir. Genetik müxtəlifliyin tədqiqi üçün marker keyfiyyətinin yaxşılaşdırılması məqsədilə yalnız minor allel tezliyi 10%-dən yuxarı olan TNP-lər

nəzərə alınmış və analizlərdə istifadə olunmuşdur. Beləliklə, filtirləmə nəticəsində yeni yaradılmış panel 401 yüksək keyfiyyətli markerdən təşkil olunmuşdur. Əldə olunmuş 18 markerin genom lokalizasiyası müəyyən edilməmiş (Nm) (Cədvəl 2), qalan TNP-lərin A, B, D genomları və xromosomlar üzrə paylanma xarakteri şəkil 2-də təqdim olunmuşdur.

Üç buğda genomu arasında B genomu ən yüksək (151 TNP), D genomu isə (88 TNP) ən aşağı marker sıxlığına malik olmuşdur. A və B genomunda xəritələşdirilmiş TNP-lərin sayının D genomu ilə müqayisədə 1.6 və 1.7 dəfə yüksək olması qeydə alınmışdır. D genomu, buğdanın təkamülü prosesində formalaşmış üç genom arasında ən gəncidir. Nisbətən qədim genomların poliploidləşmə zamanı gen duplikasiyasına məruz qalması və polimorfizmlə nəticələnən çox sayda mutasiyalar toplaması güman olunur. *T. aestivum* və onun tetraploid əcdadı *T. turgidum* (AABB) arasında əhəmiyyətli dərəcədə gen axını baş verə bildiyi halda, heksaploid buğda və *Ae. tauschii* (DD) arasında bu proses baş verməmişdir. Bu isə, öz növbəsində, müxtəlifliyin və variasiyanın A və B genomlarında D genomuna nisbətən daha çox toplanmasına səbəb olmuşdur (Dvorak et al., 2006; Berkman et al., 2013).

21 xromosom arasında 1B və 3B xromosomları ən çox, 3D və ən kiçik buğda xromosomu olan 4D isə ən az TNP ilə səciyyələnmişlər. Alınmış nəticələr Edae və əməkdaşlarının (2015) tədqiqatları ilə uzlaşır. A genomu daxilində 4 A xromosomu mimimum sayda TNP-lərə malik olmuşdur. 4A xromosomunda yerləşən molekulyar markerlərin sayının azlığı bu xromosomlarda baş verən qədim, qeyri-homoloji translokasiyalarla əlaqədar ola bilər.

Tranzisiya tipli TNP-lərin rastgəlmə tezliyi (84%) transversiya tipli TNP markerlərdən (16%) kifayət qədər yüksək olub, Ts/Tv nisbəti 5.3 vahid təşkil etmişdir (Cədvəl 2). Tranzisiya və transversiya nisbətinin yüksək olması buğda bitkisində poliploidləşmə zamanı metilləşmə tezliyinin artması ilə də əlaqədar ola bilər. Tranzisiyalar arasında ən çox rastgəlinən C/T (177 TNP), transversiyalar arasında isə G/T əvəzetmələridir.



Şəkil 2. PZR-genotipləşdirmə panelinə daxil olan TNP markerlərin A, B və D genomu (A) və xromosomlar (B) boyunca paylanması

Cədvəl 2. Buğdanın üç homeoloji genomu üzrə tək nukleotid əvəzetmələrinin tipi və paylanması

Parametrlər	Genom				Ümumi
	A	B	D	Nm	
TNP sayı	144	151	88	18	401
Tranzisiya	119	130	75	13	337
A/G	-	-	-	1	1
C/T	54	71	46	6	177
G/A	65	59	29	6	159
Ts%	82.6	86	85.2		84
Transversiya	25	21	13	5	64
G/T	12	13	6	-	31
C/A	12	7	5	2	26
A/C	-	-	-	2	2
A/T	-	-	-	1	1
T/A	-	1	-	-	1
C/G	1	-	1	-	2
G/C	-	-	1	-	1
Tv%	17.4	14	14.8		16
Ts/Tv	4.8	6.2	5.8		5.3

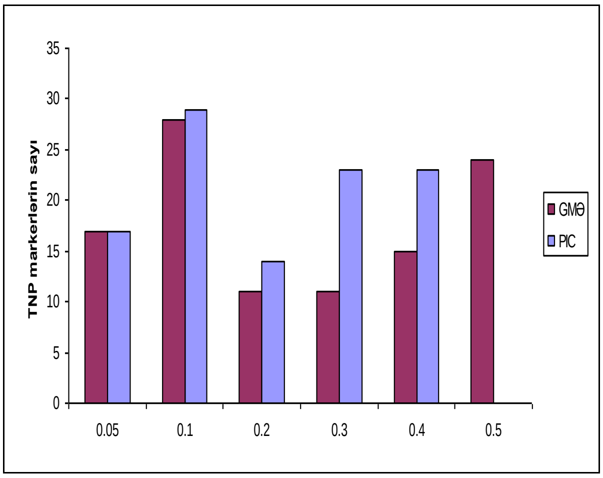
Hazırlanmış panel 69 nümunədən ibarət yumşaq buğda (*T. aestivum* L.) kolleksiyasında yoxlanılmışdır. Analizlər 105 yüksək keyfiyyətli TNP-lərlə həyata keçirilmişdir.

Hər bir genom daxilində 4-cü homeoloji qrup xromosomları ən az marker sayı ilə xarakterizə olunmuşdur. TNP markerlərdən 2-si (C/T və G/A) tranzisiya və 3-ü (C/A, G/T və T/A) transversiya tipli olmuş, tranzisiyalar ümumi TNP-lərin 84%, transversiyalar isə cəmi 16%-ni təşkil etmişdir.

105 TNP markeri üzrə genetik müxtəliflik əmsalı (GMƏ) 0.014-0.50, polimorfizm informasiya tutumu (PIC) isə 0.014-0.375 arasında dəyişmiş, kolleksiya üçün orta göstərici, müvafiq olaraq, 0.252 və 0.205 vahid təşkil etmişdir. TNP markerlərin 43%-i üçün qeyd olunan parametrlər çox aşağı (0.01-0.1) qiymətlərlə səciyyələndiyindən (Şəkil 3) bu, ümumi orta göstəricilərin də aşağı olmasına gətirib çıxarmışdır.

Yumşaq buğda növmüxtəliflikləri arasında ən yüksək polimorfizm var. *ferrugineum* və var. *milturum*, ən az müxtəliflik isə var. *hostianum* üçün qeydə alınmışdır (Cədvəl 3).

69 *T. aestivum* nümunəsi üçün 105 marker əsasında hesablanmış Ney genetik məsafə indeksi 0.01-0.49 arasında dəyişməklə, orta hesabla 0.24 vahid olmuşdur. AmpliSeq nəticələrinin analizi əsasında ikidən çox nümunə sayı ilə təmsil olunan 11 növmüxtəlifliyi arasında var. *erythrospermum* və var. *ferrugineum*, həmçinin var. *milturum* və var. *ferrugineum*-un genetik baxımdan yaxın, var. *albidum* və var. *hostianum*-un isə genetik baxımdan uzaq olması müəyyən edilmişdir (Cədvəl 4).



Şəkil 3. 69 *T. aestivum* genotipində 105 TNP markeri üçün genetik müxtəliflik əmsalı və PIC dəyərinin paylanması

Cədvəl 3. 69 yumşaq buğda nümunəsindən ibarət kolleksiyada növmüxtəlifliklər üzrə polimorfizm informasiya tutumu

Növmüxtəliflikləri	Nümunə sayı	PIC
var. *albidum*	5	0.123
var. *alborubrum*	5	0.134
var. *barbarossa*	3	0.121
var. *erythrospermum*	11	0.171
var. *ferrugineum*	9	0.192
var. *graecum*	8	0.172
var. *hostianum*	3	0.075
var. *lutescens*	8	0.174
var. *meridionale*	2	0.127
var. *milturum*	7	0.192
var. *velutinum*	2	0.111
Ümumi kolleksiya	**69**	**0.205**

Klaster analizi ilə tərtib olunan dendroqramda 69 yumşaq buğda genotipi 5 klasterdə qruplaşmışdır (Şəkil 4). Klasterlərdə genotip sayı 4 (klaster 4) - 23 (klaster 1) arasında dəyişmişdir.

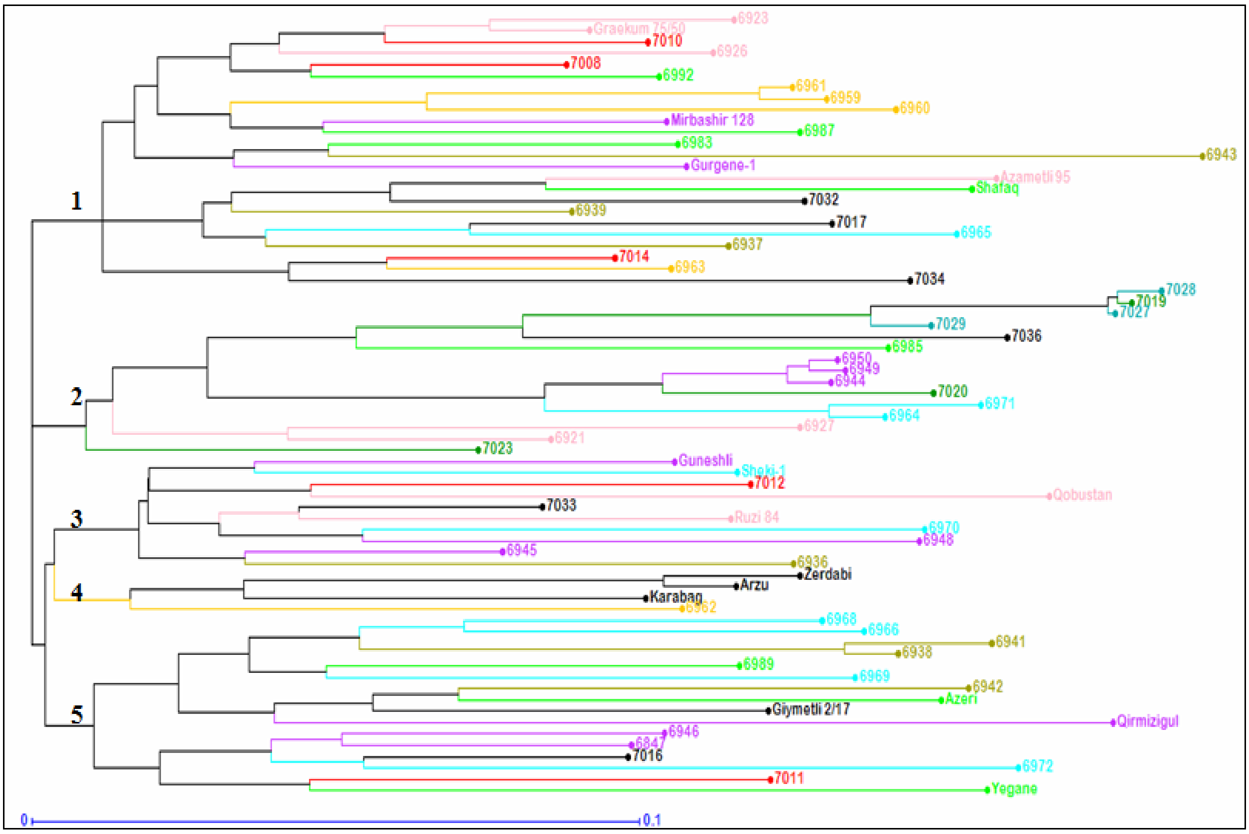
Müəyyən subklasterlərdə eyni növmüxtəlifliklərinə aid genotiplərin birgə qruplaşması müşahidə olunmuşdur. 5 var. *alborubrum* nümunəsindən 4-ü I klasterdə yer almış, onlardan üçü (6959, 6960 və 6961) homogen qrup əmələ gətirmişdir.

Oxşar qruplaşma 8 var. *graecum* üçün də qeydə alınmış, I klasterə düşən 4 genotipdən 3-ü kiçik qrup şəklində birləşmişdir. Tədqiqata cəlb olunmuş 3 var. *hostianum* nümunəsinin isə hamısı

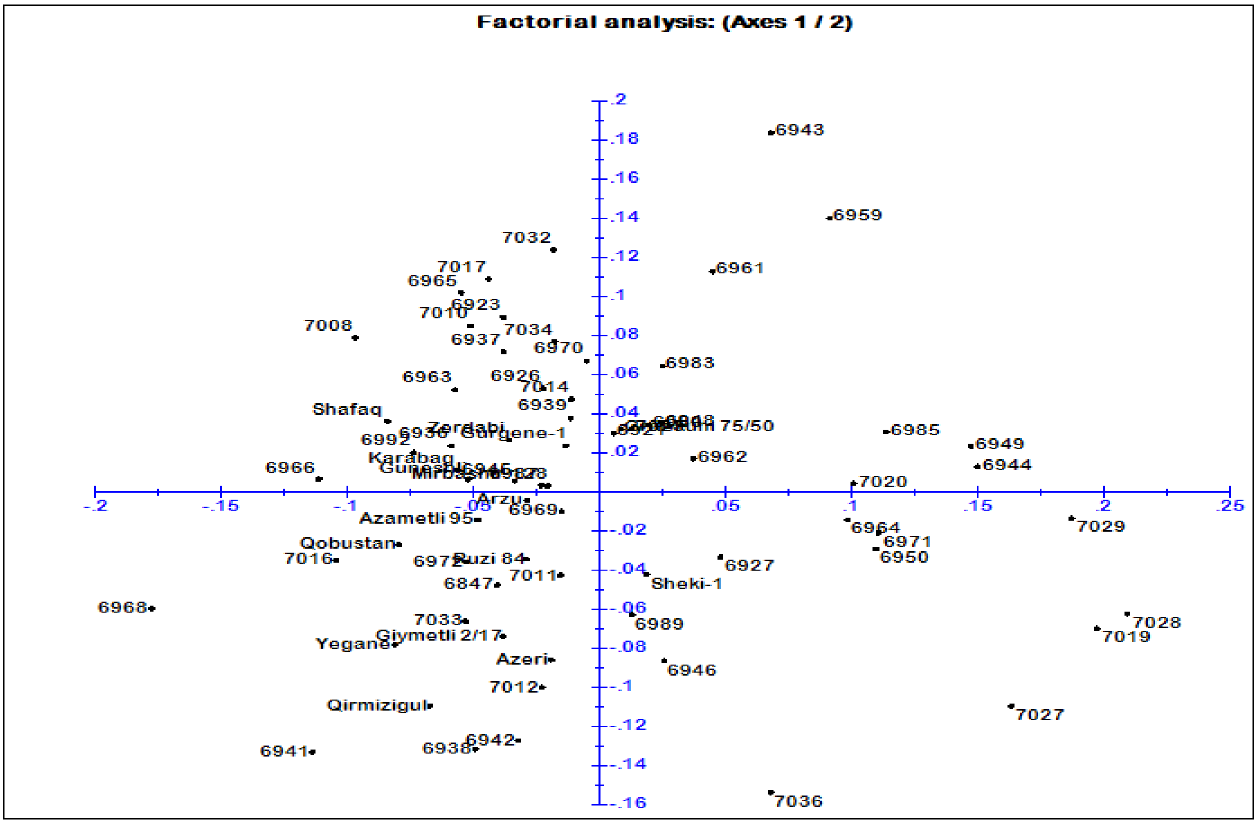
(7027, 7028, 7029) II klasterdə bir-birinə genetik baxımdan çox yaxın məsafədə yerləşmişdir. GBS analizində olduğu kimi, Günəşli, Şəki 1 və Ruzi 84 sortlarının da birgə qruplaşması müşahidə olunur. Ümumilikdə, nümunələrin dendroqramda bir-birinə nəzərən yerləşmə xarakteri GBS analizi ilə uyğunluq təşkil etmişdir.

Cədvəl 4. Yumşaq buğda növmüxtəliflikləri arasında Ney genetik məsafə indeksi

Növmüxtəliflikləri	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. var. *albidum*	0.000									
2. var. *alborubrum*	0.088									
3. var. *barbarossa*	0.137	0.121								
4. var. *erythrospermum*	0.065	0.076	0.089							
5. var. *ferrugineum*	0.068	0.071	0.095	0.035						
6. var. *graecum*	0.065	0.067	0.115	0.046	0.040					
7. var. *hostianum*	0.252	0.215	0.130	0.177	0.179	0.203				
8. var. *lutescens*	0.067	0.064	0.091	0.043	0.040	0.044	0.179			
9. var. *meridionale*	0.114	0.122	0.171	0.098	0.085	0.085	0.226	0.097		
10.var. *milturum*	0.070	0.084	0.106	0.064	0.035	0.056	0.194	0.047	0.080	
11.var. *velutinum*	0.177	0.188	0.200	0.121	0.116	0.135	0.205	0.111	0.170	0.134



Şəkil 4. Amplikon sekvensləmə TNP verilənləri əsasında 69 *T. aestivum* nümunəsi arasında genetik qohumluğu əks etdirən dendroqram. Müxtəlif rənglər növmüxtəlifliklərinin göstərir.



Şəkil 5. Ampliseq verilənləri əsasında PCoA analizi ilə 69 yumşaq buğda nümunəsinin koordinant müstəvisi üzərində paylanması

PCoA analizi ilə ilk üç koordinant variasiyanın 22.5%-ni izah etmişdir (Şəkil 5). Qrekum 75/50 və Şəki 1 sortlarının çıxmaq şərtilə, qalan bütün sortlar koordinant müstəvisinin sol hissəsində qruplaşmışdır. ICARDA/CIMMYT Beynəlxalq seleksiya mərkəzi materiallarından əldə olunmuş Qiymətli 2/17, Əzəmətli 95, Qobustan kimi sortların da genetik baxımdan yaxın olması və müstəvidə yaxın məsafədə yerləşməsi müşahidə olunur.

Yumşaq buğda kolleksiyasında yeni yaradılmış amplikon sekvensi (PZR-genotipləşdirmə) paneli vasitəsilə genetik müxtəlifliyin və qohumluğun qiymətləndirilməsi panelin effektivliyini təsdiq etmiş oldu. Genotipləşdirmə panelinə daxil edilmiş TNP markerlər həm nümunələr arasından unikal profilə malik genotipləri aşkar etməyə, həm də bütöv kolleksiyada genetik müxtəlifliyin ümumi mənzərəsini yaratmağa imkan verir. TNP paneli bütün nümunələri differensiasiya etmiş və onları genetik yaxınlıq dərəcələrinə görə düzgün şəkildə qruplaşdırmışdır. Alınmış nəticələrin GBS analizi ilə uzlaşması panelin etibarlılığını daha da artırır. Hazırlanmış panel bərk və yumşaq buğda bitkisi üzrə aparılacaq genotipləşdirmə tədqiqatlarında və gələcək genotip-fenotip assosiasiya analizlərində yüksək etibarlı metod kimi istifadə oluna bilər.

ƏDƏBİYYAT

Appels R., Eversole K., Feuillet C., Keller B., Rogers J., Stein N., Pozniak C.J., Choulet F., Distelfeld A., Poland J., Ronen G. (2018) Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science*, **361**: p. eaar7191.

Balfourier F., Bouchet S., Robert S., De Oliveira R., Rimbert H., Kitt J., Choulet F., Paux E. (2019) International Wheat Genome Sequencing Consortium and BreedWheat Consortium. Worldwide phylogeography and history of wheat genetic diversity. *Science Advances*, **5(5):** p. eaav0536.

Berkman P.J., Visendi P., Lee H.C., Stiller J., Manoli S., Lorenc M.T., et al. (2013) Dispersion and domestication shaped the genome of bread wheat. *Plant Biotechnol. J.,* **11:** 564–571.

Bradbury P.J., Zhang Z., Kroon D.E., Casstevens T.M., Ramdoss Y., Buckler E.S. (2007) TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*, **23(19):** 2633-2635.

Dvorak J., Akhunov E.D., Akhunov A.R., Deal K.R., Luo M.C. (2006) Molecular characterization of a diagnostic DNA marker for domesticated tetraploid wheat provides evidence for gene flow from wild tetraploid wheat to hexaploid wheat. *Mol. Biol. Evol.,* **23:** 1386–1396.

Edae E.A., Bowden R.L., Poland J. (2015) Application of Population Sequencing (POPSEQ) for Ordering and Imputing Genotyping-by-Sequencing Markers in Hexaploid Wheat. *G3*, **5(12):** 2547–2553.

Gao L., Fang Z., Zhou J., Li L., Lu L., Li L., Li T., Chen L., Zhang W., Zhai W., Peng H. (2018) Transcriptional insights into the pyramided resistance to rice bacterial blight. *Scientific reports*, **8:** 5-11.

Jamann T.M., Sood S., Wisser R.J., Holland J.B. (2017) High-throughput resequencing of maize landraces at genomic regions associated with flowering time. *PloS ONE*, **12(1):** p.e0168910.

Lynch J.P. (2007) Roots of the second green revolution. *Australian Journal of Botany,* **55:** 493-512.

Ogiso-Tanaka E., Shimizu T., Hajika M., Kaga A., Ishimoto M. (2019) Highly multiplexed ampliseq technology identifies novel variation of flowering time-related genes in soybean (Glycine max). *DNA Research*, **26(3):** 243-260.

Perrier X., Jacquemoud-Collet J.P. (2006) DARwin software http://darwin.cirad.fr/darwin

Ray D.K., Mueller N.D., West P.C., Foley J.A. (2013) Yield trends are insufficient to double global crop production by 2050. *PLoS ONE,* **8:** e66428.

Schnable Lab [Internet]. Genotyping by multiplexing amplicon sequencing (GBMAS); c2001-2015 [updated 2015 Jul 6; cited 2015 Jul 29]. Available: http://schnablelab.plantgenomics.iastate.edu/resources/protocols/. Accessed 29 Jul 2015.

Tanaka T., Ishikawa G., Ogiso-Tanaka E., Yanagisawa K., Sato K. (2019) Development of genome-wide SNP markers for barley via reference-based RNA-Seq analysis. *Frontiers in Plant Science*, **10:** Article No 577, 9 pages.

Создание панели генотипирования для пшеницы на основе технологии AmpliSeq

М.А. Аббасов

Институт генетических ресурсов НАН Азербайджана, Баку, Азербайджан

ПЦР-GBS или секвенирование ампликонов с использованием селективных праймеров - это альтернативный метод снижения сложности генома и незаменимый инструмент для селекции растений и геномных исследований. Впервые в исследовании была разработана панель ПЦР-генотипирования, охватывающая геном пшеницы (A, B и D) и состоящая из 830 праймеров. Авнель, созданная в результате фильтрации, состояла из 401 высококачественного маркера. Среди трех геномов пшеницы, геном B обладал самой высокой (151 однонуклеотидных полиморфизма или ОНП), а геном D (88 ОНП) - самой низкой плотностью маркеров. Хромосомы 1B и 3B характеризуются наибольшим, а 3D и 4D - наименьшим количеством ОНП. Частота встречаемости ОНП маркеров транзиционного (Ts) типа (84%) была значительно выше, чем у ОНП маркеров трансверсионного (Tv) типа (16%), в соотношении Ts/Tv, равной 5,3 единиц. Надежность новой панели генотипирования была проверена в коллекции мягкой пшеницы (*T. aestivum* L.). Коэффициент генетического разнообразия и величина информационного полиморфизма для 69 образцов пшеницы составляли 0,252 и 0,205 единиц соответственно. Самый высокий полиморфизм был выявлен у

разновидностей var. *ferrugineum* и var. *milturum*, самое низкое разнообразие определено для var. *hostianum.* С помощью PCoA анализа были даны разъяснения 22,5% вариаций первых трех координат. Таким образом, ОНП маркеры, включенные в панель генотипирования, позволили выявлять генотипы с уникальными профилями, а также создать общую картину генетического разнообразия во всей коллекции.

Ключевые слова: *Геном мягкой пшеницы, ПЦР-GBS, секвенирование ампликонов, мультиплексирование, ОНП, транзиция, трансверсия*

Development of genotyping panel for wheat using AmpliSeq technology

M.A.Abbasov

Genetic Resources Institute, Azerbaijan National Academy of Sciences, Baku, Azerbaijan

PCR-GBS or multiplexing amplicon sequencing is an alternative method for reducing genome complexity with the use of selective primers and is an indispensable tool for plant breeding and genome research. In the research work, for the first time, a PCR-genotyping panel comprising 830 primers spread across the wheat genome (A, B and D) was developed. After filtration, the newly created panel consisted of 401 high quality markers. Among the three wheat genomes, the B genome had the highest (151 single nucleotide polymorphism (SNPs)), and the D genome (88 SNPs) had the lowest marker density. Out of 21 chromosomes, 1B and 3B were characterized with the highest, and chromosomes 3D and 4D with the least SNPs. The frequency of transition-type SNPs (84%) was significantly higher than transversion-type SNP markers (16%), with Ts/Tv ratio equal to 5.3. The reliability of the new genotyping panel was tested in the bread wheat (*T. aestivum* L.) collection. The genetic diversity coefficient and polymorphism information content for 69 bread wheat accessions were 0.252 and 0.205, respectively. The highest polymorphism was observed for var. *ferrugineum* və var. *milturum*, and the least variation was for var. *hostianum*. Using the PCoA analysis, 22.5% of the variations of the first three coordinates were elucidated. Thus, SNP markers included in the genotyping panel allowed identifying genotypes with unique profiles, as well as to generate a general picture of genetic diversity in the whole collection.

Keywords: *Bread wheat genome, PCR-GBS, amplicon sequencing, multiplexing, SNP, transition, transversion*